



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  A61K 47/48		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/14215  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. April 1998 (09.04.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/05389  (22) Internationales Anmeldedatum: 1. Oktober 1997 (01.10.97)		(74) Gemeinsamer Vertreter: SYNTESOME GESELLSCHAFT FÜR MED. BIOCHEMIE M.B.H.; Heimdallstrasse 4, D-81739 München (DE).	
(30) Prioritätsdaten: 196 40 791.5 2. Oktober 1996 (02.10.96) DE		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): SYNTESOME GESELLSCHAFT FÜR MED. BIOCHEMIE M.B.H. [DE/DE]; Heimdallstrasse 4, D-81739 München (DE).</p> <p>(71)/(72) Anmelder und Erfinder: BOVIN, Nikolai [RU/RU]; Artsimovicha strasse 11-181, Moscow, 117871 (RU). MATROSOVICH, Mikhail [RU/RU]; Ramenka strasse 9/2-287, Moscow, 117607 (RU). TUZIKOV, Alexandre [RU/RU]; Ismaylovski strasse 47-4, Moscow, 105037 (RU). CHINAREV, Alexandre [RU/RU]; Miklukho-Maklaya strasse 16/10, Moscow, 117871 (RU). GAMBARYAN, Alexandre [RU/RU]; Vargy strasse 40-71, Moscow, 117133 (RU). ROBERTSON, James [GB/GB]; Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG (GB).</p>		<p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Title: GLYCOCONJUGATES AS VIRUS CELL ADHESION INHIBITORS</p> <p>(54) Bezeichnung: GLYCOKONJUGATE ALS INHIBITOREN DER VIRALEN ZELLADHÄSION</p> <p style="text-align: center;"> <span style="float: right;">(1)</span> </p> <p>(57) Abstract</p> <p>The host-cell adhesion by human influenza viruses is inhibited by new compounds of the general formula (1), where R<sup>1</sup> stands for acyl or a thioacyl group; R<sup>2</sup> for hydroxyl, Z-alkyl, substituted Z-alkyl, Z-aryl, substituted Z-aryl, and Z corresponds to O, S or NH; R<sup>3</sup> stands for an acyl or a thioacyl group; R<sup>4</sup> for H or acyl; X for O, S, SH<sub>2</sub> or a sugar, and where W is a bifunctional spacer and P a multivalent vector consisting of one of the following substances: polyacrylate, polyacrylamide, N-substituted polyacrylamide, metacrylamide, N-substituted metacrylamide, polyacrylic acid, polycarbonate, polyester, polyamide, polyanhydride, polyiminocarbonate, polyorthoester, polydioxanone, polyphosphazene, polyhydroxy carboxylic acid, polyamino acid, polysaccharide, protein, dextran, chitosan, glucan, liposome, microparticles. The inventive compounds are capable of bonding authentic human viruses from the A (H1 and H3) groups, which have not been adapted through culturing in chicken eggs.</p>			

## (57) Zusammenfassung

Die Adhäsion menschlicher Influenza Viren an Wirtszellen wird durch neue Verbindungen der allgemeinen Formel (I) inhibiert worin, R<sup>1</sup> eine Acyl oder Thioacetylgruppe bedeutet; R<sup>2</sup> H, Hydroxyl, Z-Alkyl, substituiertes Z-Alkyl, Z-Aryl, substituiertes Z-Aryl bedeutet, und Z O, S oder NH entspricht; R<sup>3</sup> eine Acyl oder Thioacetylgruppe bedeutet; R<sup>4</sup> H oder Acyl darstellt; X O, S oder ein lineares C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl bedeutet; Y NH, O, S, CH<sub>2</sub> oder ein Zucker ist; W ein bifunktioneller Spacer ist P ein multivalenter Träger bestehend aus einem der nachfolgenden Stoffe ist: Polyacrylat, Polyacrylamid, N-substituiertes Polyacrylamid, Metacrylamid, N-substituiertes Metacrylamid, Polyacrylsäure, Polycarbonat, Polyester, Polyamid, Polyanhydrid, Polyiminocarbonat, Polyorthocarbonat, Polydioxanon, Polyphosphazen, Polyhydroxycarbonsäure, Polyaminosäure, Polysaccharid, Protein, Dextran, Chitosan, Glucan, Liposom, Micropartikel. Die neuen Verbindungen binden authentische, nicht durch Anzucht in Hühnereiern adaptierte menschliche Viren der Typen A (H1 und H3) und B.

## ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäß dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gaben	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die chenafige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
RJ	Bein	IR	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

Glycokonjugate als Inhibitoren der viralen ZelladhäsionBeschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft neue multivalente Derivate von Neu5A $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc und die Herstellung dieser Verbindungen. Sie betrifft weiterhin die Verwendung dieser Verbindungen als Inhibitoren der viralen Zelladhäsion nicht-adaptierter menschlicher Influenza Viren.

Der erste essentielle Schritt einer viralen Infektion besteht in der Adhäsion eines 10 Virus an die Oberfläche der Wirtszelle. Im Falle von Influenza Viren der Typen A und B, geschieht dies über die Bindung des viralen Hemagglutinins(HA) an terminale Sialyloligosaccharide von Glycoproteinen und Glycolipiden auf der Zelloberfläche der Wirtszelle. Eine mögliche Strategie zur Verhinderung von Influenza Infektionen besteht 15 in der Verwendung von Inhibitoren der Zelladhäsion, diese sollen sich mit den viralen Hemagglutininen verbinden und deren Reaktion mit den Wirtszellen hemmen.

In der Literatur sind bereits eine Reihe von Inhibitoren der Adhäsion von 20 Influenza Viren bekannt. Insbesondere durch die Entwicklung von multivalenten Verbindungen konnten einige Inhibitoren gefunden werden, welche jeweils die Adhäsion eines bestimmten Influenza Stammes in einem in-vitro Test erfolgreich verhindern (siehe Tabelle 2).

Ein Nachteil dieser bekannten Inhibitoren liegt in ihrem engen Wirkungsspektrum, die Verbindung zeigen jeweils nur gegen einen einzigen Stamm hohe Aktivität und sind somit für eine praktische prophylaktische oder therapeutische Anwendungen nur wenig geeignet.

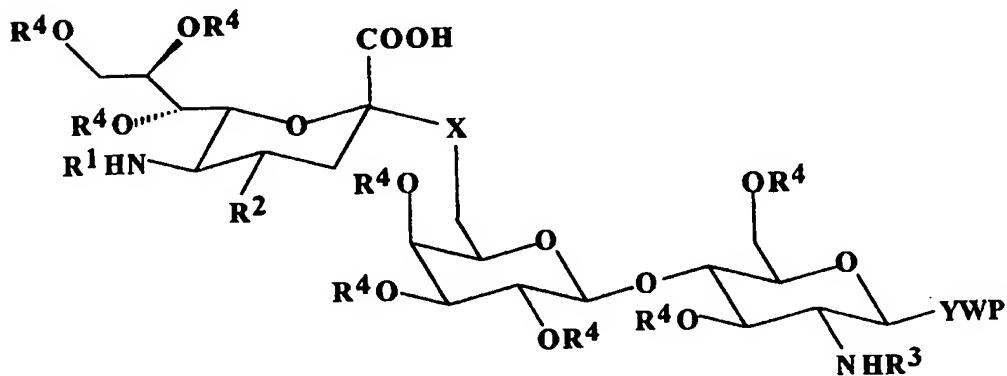
25 Ein weiterer Nachteil ist, daß die Aktivität dieser bekannten Inhibitoren jeweils nur gegenüber adaptierten Influenza Stämmen gezeigt wurde, welche auf embryonalen Hühnereiern angezogen worden sind. Es ist bekannt, daß die Anzucht menschlicher Influenza Viren auf Hühnereiern zu Aminosäure Mutationen in der Region der Rezeptorbindestelle des Hemagglutinins führt (Robertson, 1993). Die auf diese Weise 30 gefundenen Inhibitoren haben zwar eine hohe Affinität zu den veränderten Hemagglutininen dieser mutierten Viren, während ihre Aktivität gegenüber Wild-Typ

Hemagglutin in vielen Fällen geringer ist (siehe polymeres Sialosid BGN-PAA in Tabelle 1).

Aufgabe dieser Erfindung war es neue Inhibitoren der viralen Zelladhäsion von menschlichen Influenza Viren zu finden. Diese Inhibitoren sollten ein breites 5 Wirkungsspektrum gegen Influenza Wild-Typ Stämme haben und hierbei eine möglichst hohe inhibitorische Aktivität besitzen.

Es wurde nun gefunden, daß multivalente Konjugate des Sialosidliganden Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (6'-Sialyl-N-acetylglucosamine, 6SLN) neue, hoch aktive Inhibitoren der viralen Zelladhäsion sind.

10 Gegenstand der Erfindung sind Verbindungen der Formel I



worin R<sup>1</sup> eine Acyl oder Thioacylgruppe bedeutet, vorzugsweise eine Acetyl-, 15 Thioacetyl-, Propionyl oder Thiopropionylgruppe ist; R<sup>2</sup> H, Hydroxyl, Z-Alkyl, substituiertes Z-Alkyl, Z-Aryl, substituiertes Z-Aryl bedeutet, und Z O, S oder NH entspricht; R<sup>3</sup> eine Acyl oder Thioacylgruppe bedeutet; R<sup>4</sup> H oder Acyl darstellt; X O, S oder ein lineares C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl bedeutet; Y NH, O, S, CH<sub>2</sub>, oder ein Zucker ist; W ein bifunktioneller Spacer ist;

20 P ein multivalenter Träger bestehend aus einem der nachfolgenden Stoffe ist: Polyacrylat, Polyacrylamid, N-substituiertes Polyacrylamid, Metacrylamid, N-substituiertes Metacrylamid, Polyacrylsäure, Polycarbonat, Polyester, Polyamid, Polyanhydrid, Polyiminocarbonat, Polyorthoester, Polydioxanon, Polyphosphazen,

Polyhydroxycarbonsäure, Polyaminosäure, Polysaccharid, Protein, Dextran, Chitosan, Glucan, Liposom, Micropartikel.

P kann auch einen niedermolekularer multivalenter Träger wie  $C(CH_2NH-A_n-)_4$  sein, worin A eine neutrale oder negativ geladene Aminosäure ist.

5 Überaschenderweise zeigte sich auch, daß Verbindungen der Formel I die Zelladhäsion aller bekannter menschlicher Influenza Stämme der Typen A und B sehr effizient inhibieren. Insbesondere sind diese Inhibitoren aktiv gegen authentische, in der Struktur der Rezeptorbindestelle des Hemagglutins nicht veränderte Influenza Viren. Um eine unveränderte Struktur der Rezeptorbindestelle des Hemagglutinins zu gewährleisten, wurden Influenza Viren aus klinischen Isolaten verwendet, welche ausschließlich auf MDCK-Zellen (Madin-Derby canine kidney cells) angezogen worden sind. Wie ein mittels PCR durchgeföhrter Vergleich der viralen RNA-Sequenzen auf MDCK gezogener Viren mit den RNA-Sequenzen von Viren aus klinischen Isolaten gezeigt hat, weisen die auf MDCK gezogene Viren keine Mutationen in der Region der Rezeptorbindestelle des Hemagglutinins auf (Robertson, 1993).

10 Tabelle 1 zeigt einen Vergleich der Inhibition der viralen Zelladhäsion durch die neue Verbindung 6SLN-PAA und durch das Glycokonjugat BGN-PAA, welches bereits früher gegen auf Hühnereiern angezogene Stämme des Typs H3N2 A/Sichuan/1/87 entwickelt wurde. Während die Verbindung 6SLN-PAA ein hervorragender Inhibitor aller authentischer Influenza Stämme ist, hat BGN-PAA ein engeres Wirkungsspektrum, und hat gegen viele Stämme nur eine sehr geringe Aktivität.

15 Die Vorteile der erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I liegen insbesondere in ihrem Wirkungsspektrum als Inhibitoren der viralen Zelladhäsion aller bekannter menschlicher Influenza Viren der Typen A und B, und in den sich daraus eröffnenden Möglichkeiten diese Verbindungen zu prophylaktischen und therapeutischen Zwecken gegen Influenza Infektionen einzusetzen.

20 Ein weiterer Vorteil liegt in der leichten Zugänglichkeit von Derivaten der Verbindungen der Formel I, welche einen zusätzlichen Marker tragen, geeignete Marker sind z. B. Biotin, Farbstoffe, Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Marker. Diese Derivate können verwendet werden als Komponenten für neue, bisher nicht zugängliche

25 Screening Systeme zur Entdeckung neuer Inhibitoren der viralen Zelladhäsion.

30

Tabelle 1.

Inhibition der viralen Zelladhäsion von Influenza Viren durch die polymeren Sialoside  
 5 BGN-PAA and 6SLN-PAA, gemessen mittels Inhibition der viralen Bindung an Fetuin,  
 wie in Beispiel 8 und in Gambaryan and Matrosovich, 1992 beschrieben.  
 BGN ist Neu5Ac $\alpha$ 2-OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NHCOCH<sub>2</sub>NH-,  
 6SLN ist Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-NHCOCH<sub>2</sub>NH-.

I. Klinische Human-Isolate, vermehrt in MDCK Zellen			
	Virus	Affinität der Bindung an Virus, K <sub>aff</sub> , $\mu$ M Neu5Ac	
		BGN-PAA	6SLN-PAA
<b>H3N2</b>			
10	A/NIB/47/89 M	0.03	0.01
15	A/NIB/3/90 M	0.01	0.01
	A/NIB/44/90 M	0.01	0.01
<b>H1N1</b>			
20	A/England/157/83 M	>100	0.03
	A/NIB/12/89 M	>5	0.1
	A/NIB/23/89 M	>5	0.02
	A/NIB/50/89 M	>5	0.02
<b>B</b>			
25	B/England/222/82 M	0.05	0.04
	B/NIB/48/90 M	0.05	0.04
	B/NIB/15/89 M	0.03	0.02
<b>II. Durch Anzucht in Hühnereiern adaptierte Stämme</b>			
<b>H3N2</b>			
30	X31 (A/Aichi/2/68)	100	3
	A/England/321/77	0.03	0.01
	A/USSR/3/85	0.06	0.1
	A/Sichuan/1/87	0.02	0.1
<b>H2N2</b>			
35	A/England/12/64	10	0.1
<b>H1N1</b>			
	A/FW/1/50	5	3
	A/USSR/90/77	6	0.3
	A/Chile/1/83	30	6
<b>B</b>			
40	B/USSR/100/83	5	2
	B/Ann Arbor/1/86	>100	3
	B/Yamagata/11/88	>100	100

Die Erfindung wird anhand der Beispiele näher und beispielhaft erläutert.

Beispiel 1.

Herstellung von Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-NHCOCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, (modifizierte Methode

5 nach Likhosherstov et al., 1986; und Manger et al., 1992)

Bei Raumtemperatur wurden 13.8 mg 6`-Sialyllactosamine NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Salz (20  $\mu$ M, isoliert aus menschlichen Urin) in 1ml gesättigter Ammoniumbicarbonat Lösung gelöst und während 170 h gerührt, während der Inkubation wurde zu der Lösung mehrmals festes 10 Ammoniumbicarbonat bis zur Sättigung zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde mit 2ml Wasser verdünnt, eingefroren und lyophilisiert. Man erhielt 13.7 mg Rückstand (war das Gewicht des erhaltenen Produktes größer als die eingesetzte Menge Saccharid, so wurde der Rückstand nochmals in 2ml Wasser aufgenommen und lyophilisiert), dieser wurde in 0.6ml 1M NaHCO<sub>3</sub> aufgenommen. Unter Rührung bei 0°C wurden 34 mg 15 Chloressigsäureanhydrid (200  $\mu$ M) in 0.34ml Ethylacetat zugegeben. Nach 1 h wurde die Lösung mit Essigsäure neutralisiert und im Vakuum eingeengt. Der erhaltene Rückstand wurde in einer minimalen Menge Wasser aufgelöst und über eine Sephadex G-25 Säule(1x50 cm) chromatographiert. Die zuckerhaltige Fraktion wurde eingeengt, und der Rückstand in 1 ml gesättigter Ammoniumcarbonat Lösung aufgenommen. Nach 20 48 h wurde die Lösung mit 2ml Wasser verdünnt, eingefroren und lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 2ml 1% Essigsäure aufgelöst und nach 15 h über eine Säule mit 3ml Dowex AG 50W-X4 (H<sup>+</sup> Form) gegeben. Die Säule wurde mit 30 ml Wasser gewaschen und dann mit einer 1M Ammoniumhydroxid Lösung eluiert. Nach Einengen des Ammoniumhydroxid Eluats wurden 9.8 mg (67%) des 6`-Sialyllactose N-glycyl 25 Derivates erhalten.

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (D<sub>2</sub>O,  $\delta$ , ppm): 5.16 (d, 1H, J<sub>2</sub> 9 Hz, H-1 Gal), 4.47 (d, 1H, J<sub>2</sub> 8 Hz, H-1 GlcNAc), 4.00-3.55 (Gal, GlcNAc, Neu5Ac), 3.46 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.69 (dd, 1H, J<sub>3ax</sub> 12 Hz, J<sub>4</sub> 4.5 Hz, H-3eq Neu5Ac), 2.04 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>CO), 1.72 (dd, 1H, J<sub>4</sub> 12.5 Hz, H-3ax Neu5Ac).

Der Verlauf der Reaktionen wurde mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt  
(Kieselgel 60, Merck):

Eluent 1: 2-Propanol/Aceton/Wasser 4:3:2:

	6`SLN	$R_f = 0.61$
5	6`SLN-NH <sub>2</sub>	0.49 Ninhydrin positiv
	6`SLN-NHCOCH <sub>2</sub> Cl	0.66
	6`SLN-NHCOCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0.09 Ninhydrin positiv

Eluent 2: Methanol/Aceton/Wasser 1:1:1:

6`SLN-NHCOCH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	0.73	Ninhydrin positiv
---	------	-------------------

10

Beispiel 2

Herstellung von Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-NHCOCH<sub>2</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COO-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>

15 Bei Raumtemperatur wurden zu einer Lösung von 7.3 mg Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-NHCOCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) aus Beispiel 1 in 0.2ml DMSO, 39 mg Bis(4-nitrophenyl)-adipat (100  $\mu$ M) in 0.6ml DMF zugegeben. Nach 3 h wurde das Reaktionsgemisch über eine Sephadex LH-20 Säule (1.8x30 cm, Eluent - Acetonitril/Wasser 1:1) chromatographiert. Die zuckerhaltige Fraktion wurde eingeengt  
20 in Wasser aufgenommen, eingefroren und lyophilisiert. Man erhielt 7.4 mg des Glykosids(76%).

Beispiel 3

Herstellung von Tetrakis(N-tert-butyloxycarbonyl-glycyl-amidomethyl)methan

25 Ein Gemisch von 1g Tetrakis(aminomethyl)methan (Fleischer et. al., 1971) tetrahydrochlorid (3.6 mmol), 8.52g BocGlyONph (28.8 mmol) und NEt<sub>3</sub> (2.5ml, 18 $\mu$ mol) in 2ml DMF wurde 120 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde eingeengt, in 100ml Ethylacetat suspendiert, und mit 2% 30 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Wasser, gesättigter NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Die Lösung wurde eingeengt, der Rückstand in Trifluoroethanol

gelöst, ein Gemisch CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH (9:3:1) und Et<sub>2</sub>O wurde zugegeben. Man erhielt 2.1 g eines krystallinen Produktes (78%).

DC: R<sub>f</sub>=0.5 in CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH/AcOH 9:3:2:0.2 (Ninhydrin-positiv, nach 5 min Behandlung der Platte mit HCl-Gas).

5    <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum in D<sub>6</sub>-DMSO ( $\delta$ , ppm): 7.97 (br t, 1H, CCH<sub>2</sub>NH), 7.37 (t, 1H, NH<sup>Gly</sup>), 3.49 (d, 2H, J<sub>NH</sub> 6 Hz, CH<sub>2</sub><sup>Gly</sup>), 2.76 (br d, 2H, CCH<sub>2</sub>), 1.37 (s, 9H, OCMe<sub>3</sub>).  
 Massenspektrum: 783 (M+Na).

Beispiel 4

10    Herstellung von Tetrakis(N-tert-butyloxycarbonyl-triglycyl-amidomethyl)methan

Eine Lösung von 0.76g Tetrakis(N-tert-butyloxycarbonyl-glycyl-amidomethyl)-methan (1 mmol) aus Beispiel 3 in 8 ml CF<sub>3</sub>COOH wurde 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 16ml Toluol versetzt und eingeengt. Der Rückstand wurde

15    in 3 ml Wasser aufgenommen, es wurden 0.35ml konzentrierte HCl (12M) zugegeben, die Lösung wurde eingeengt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das gebildete Tetraamin wurde in 18ml DMF suspendiert, es wurden 1.45g BocGlyGlyONsu (4.4 mmol) und 0,6ml Et<sub>3</sub>N zugegeben. Die Reaktionslösung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt, im Vakuum (0.5-1 Torr) eingeengt und der erhaltene

20    Rückstand über eine Kieselgelsäule chromatographiert (Kieselgel 60, Merck). Elution mit Me<sub>2</sub>CO/MeOH/H<sub>2</sub>O zwischen 30:1:1 und 15:1:1 ergab 0.94 g (77%) des reinen Produktes. DC: R<sub>f</sub>=0.79 in Me<sub>2</sub>CO/MeOH/H<sub>2</sub>O 15:1:1 (Ninhydrin positiv, nach 5 min Behandlung der Platte mit HCl-Gas)

25    <sup>1</sup>H NMR-Spektrum in D<sub>6</sub>-DMSO ( $\delta$ , ppm): 8.53 (t, 1H, NH<sup>Gly3</sup>), 7.98 (t, 1H, CCH<sub>2</sub>NH), 7.81 (t, 1H, NH<sup>Gly2</sup>), 6.98 (t, 1H, NH<sup>Gly1</sup>), 3.85 (d, 2H, J<sub>NH</sub> 5.5 Hz, CH<sub>2</sub><sup>Gly2</sup>), 3.73 (d, 2H, J<sub>NH</sub> 5.5 Hz, CH<sub>2</sub><sup>Gly3</sup>), 3.59 (d, 2H, J<sub>NH</sub> 6 Hz, CH<sub>2</sub><sup>Gly1</sup>), 2.69 (br. d, 2H, J<sub>NH</sub> 6.5 Hz, CCH<sub>2</sub>), 1.38 (s, 9H, OCMe<sub>3</sub>). Massenspektrum: 1239 (M+Na).

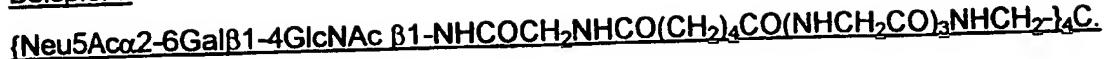
**Beispiel 5****Poly-N-(2-Hydroxyethyl)-acrylamid mit 20% mol. 6SLN, (6SLN-PAA)**

5 Zu einer Lösung von 1mg 6SLN-Gly (1.37  $\mu$ M) aus Beispiel 1 in 0.1ml DMSO wurden 1.32 mg Poly(4-nitrophenylacrylat) (6.84  $\mu$ M) und 7ml Et<sub>3</sub>N in 0.132 ml DMF zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 40°C inkubiert (der Verlauf der Konjugation wurde mittels DC verfolgt: Verschwinden des Fleckes des Zucker Eduktes), nach 24 h wurden 23 $\mu$ l Ethanolamin zugegeben. Nach weiteren 15 h bei

10 Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung über eine Sephadex LH-20 Säule (1.5x25 cm, Eluent - Acetonitril/Wasser 1:1) chromatographiert. Die zuckerhaltige Fraktion wurde eingeengt, in Wasser aufgenommen, eingefroren und lyophilisiert. Es wurden 1.6 mg des Konjugat erhalten(90%).

**15 Beispiel 6****Polyacrylsäure (Na<sup>+</sup>-salt) mit 20% mol. 6SLN**

Zu einer Lösung von 1 mg 6SLN-Gly (1.37  $\mu$ M) in 0.1 ml of DMSO, wurde 1.32 mg Poly(4-nitrophenylacrylate) (6.84  $\mu$ M) in 0.132 ml DMF und Et<sub>3</sub>N (7  $\mu$ l) zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde bei 40°C inkubiert (der Verlauf der Konjugation wurde mittels DC verfolgt: Verschwinden des Fleckes des Zucker Eduktes), nach 24 h wurden 230 $\mu$ l 0.1 M NaOH zugegeben. Nach 15 h bei Raumtemperatur wurden 15  $\mu$ l 1M HCl zugegeben und das Reaktionsgemisch über eine Sephadex LH-20 Säule (1.5x25 cm, Eluent - Acetonitrile/Wasser 1:1) chromatographiert. Die zuckerhaltige Fraktion wurde eingeengt, in Wasser aufgenommen, eingefroren und lyophilisiert. Es wurden 1.5 mg Konjugat erhalten (93%).

Beispiel 7

5 Eine Lösung von 1.2mg Tetrakis(N-tert-butyloxycarbonyl-triglycyl-amidomethyl)methan (1  $\mu$ M) aus Beispiel 4 in 0.1 ml  $\text{CF}_3\text{COOH}$  wurde bei Raumtemperatur gerührt. Nach 15 h wurde 1ml Toluol zugegeben und die Lösung eingeengt. Der Rückstand wurde in 0.5 ml Wasser gelöst, es wurden 5  $\mu$ l konzentrierte HCl zugegeben, die Lösung eingeengt und der Rückstand im Vakuum getrocknet. Das erhaltene Tetraamin wurde 10 in 0.2 ml DMF suspendiert, und eine Lösung von 4.9mg Neu5Ac $\alpha$ 2-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-NHCOCH<sub>2</sub>NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COO-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub> (5  $\mu$ M) in 0.3 ml DMF und 5  $\mu$ l NEt<sub>3</sub> wurde zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 15 h bei 20°C gerührt. Es wurden 10  $\mu$ l konzentrierte Ammoniak-Lösung zugegeben und nach einer Stunde 15 wurde die Reaktionslösung über eine Sephadex G-50 (1.2x50 cm) gegeben (Eluent 0.05 M Ammoniak Lösung). Die zuckerhaltige Hauptfraktion wurde eingeengt, in Wasser aufgenommen, eingefroren und lyophilisiert. Es wurden 2.9mg Konjugat erhalten (68%).

20 Beispiel 8

Anzucht der Influenza Viren, und Bestimmung der Inhibition der viralen Bindung an Fetusin

Die nicht adaptierten menschlichen Influenza Viren A/England/157/83 M, A/NIB/12/89 25 M, A/NIB/23/89 M, A/NIB/50/89 M (H1N1), A/NIB/47/89 M, A/NIB/3/90 M, A/NIB/44/90 M (H3N2), B/England/222/82 M, B/NIB/48/90 M, and B/NIB/15/89 M wurden vom National Institute for Biological Standardisation and Control (NIBSC, Potters Bar/UK) erhalten, sie waren aus klinischen Proben isoliert und wurden ausschliesslich in MDCK Zellen gezüchtet.

Die in Hühnereiern gezüchteten Influenza Viren wurden von der Viren Stammsammlung des D.I.Ivanovsky Institutes für Virology, Moskau erhalten. Diese Viren wurden in 9-10 Tage alten embryonalen Hühnereiern inkubiert.

Für die Untersuchung der viralen Bindung, wurden die virushaltigen Kulturüberstände

5 bzw. allantoissche Flüssigkeiten durch Zentrifugation von etwaigen Zellbruchsstücken befreit. Diese Lösungen wurden ohne weitere Aufreinigung entweder sofort eingesetzt oder bis zu 4 Wochen bei 4°C gelagert.

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Rinderfetuin (Fluka, CH) wurden folgendermassen durchgeführt: Die Kavitäten einer 96er EIA Mikrotiterplatte aus

10 Polystyrol(Flow, USA) wurden bei mit jeweils 0.1ml einer Fetus Lösung in PBS (10 mg/ml) 2h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde mit einer Lösung 0.01% Tween 20 (Serva, D) in PBS und dann mit destillierten Wasser gewaschen, und entweder direkt verwenden, oder an der Luft getrocknet und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Um die Viren spezifisch an die Fetus beschichteten Platten zu adsorbieren, wurden 15 die viralen Kulturen mit PBS bis auf einen Hemmagglutinin-Titer von 1:50-1:200 verdünnt. Die Platten wurden dann mit je 0.1ml dieser Lösung pro Kavität für 2 h bei 4°C inkubiert.

Die Inhibition der Bindung des Meerrettich-Peroxidase-Fetuin Konjugates (hergestellt nach der Perjodat Aktivierungs Standardmethode) an die adsorbierten Viren wurde wie

20 folgt bestimmt:

Die Platten wurden mit einer 0.01% Tween 20 Lösung in PBS gewaschen, dann wurden 0.1 ml einer 0.02 µM Lösung des Peroxidase-Fetuin Konjugates und gleichzeitig verschiedene Konzentration des zu testenden Inhibitors zugegeben. Nach einer Inkubationzeit von 1 h bei 4°C wurden die Platten mit einer kalten PBS/Tween 25 Lösung gewaschen.

Die Peroxidase Aktivität wurde durch Zugabe von je 0.1 ml einer Substratlösung (0.4 mg/ml o-Phenyldiamin plus 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM Natriumacetat Puffer, pH 5.5) bestimmt. Nach Zugabe der Substratlösung wurden die Platten 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, dann wurden 0.05ml 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zugegeben und

30 die Absorbtion bei 492nm mit einem Titertek Multiscan reader (Flow, Finland) bestimmt.

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung, wurden auf jeder Platte einige Kavitäten ohne Zugabe von Viren inkubiert. Es wurde jeweils nur sehr geringe unspezifische Bindung gefunden ( $A_{492}$  Werte von 0.05-0.2).

Zur Bestimmung der maximalen Bindung  $A_{max}$  wurde für jede einzelne Platte die

5 Bindung des Peroxidase-Fetuin-Konjugates ohne Inhibitor Zugabe gemessen.  
 Als weitere Kontrolle wurde jeder einzelnen Virus Stamm mit einem Peroxidase-Fetuin-Konjugat umgesetzt, welcher zuvor mit Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* umgesetzt worden war. In allen Fällen verlor das Konjugat seine Affinität zu Viren, somit wurde bewiesen, daß die Wechselwirkung zwischen Konjugat und Viren durch

10 Sialyloligosaccharide bedingt ist.

Die Bindungs Affinität wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$K_{aff} = \frac{C_i \times A_i (A_{max} - A_0)}{A_{max} (A_i - A_0)}$$

hierbei ist  $K_{aff}$  die Dissoziationskonstante des Virus-Inhibitor Komplexes;  $A_{max}$  ist die gemessene Absorbtion in Abwesenheit des Inhibitors;  $C_i$  und  $A_i$  sind die eingesetzte Inhibitor Konzentration und die entsprechende gemessene Absorbtion;  $A_0$  ist die bei

20 Sättigung an Inhibitor gemessene Absorption.

Die Ergebnisse der Inhibition der viralen Zelladhäsion des neuen Konjugates 6SLN-PAA aus Beispiel 5 sind in Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2:

Inhibition der viralen Zelladhäsion von Influenza Viren durch Sialosid Inhibitoren. Die Literaturdaten wurden zusammengefasst, wobei jeweils die höchste genannte inhibitorische Aktivität aufgeführt wird. Die Aktivität wird ausgedrückt in  $\mu\text{M}$

5 Konzentration an Neu5Ac Gruppen des Inhibitors, welche eine 50% Inhibition verursachen.

Verwendete Testsysteme: Inhibition der Hemagglutination (HAI), Inhibition der Virus Adsorption an Erythrocyten (AI), Verringerung der viralen Vermehrung in Zellkulturen (MI), Verringerung der viralen Bindung an Fetuin (FBI).

10 Zum Vergleich sind zuunterst die Daten der Verbindung 6SLN-PAA aus Beispiel 5 aufgeführt.

	Verbindungstyp	Test	$\mu\text{M}$ Neu5Ac-Gruppen, bei 50% Inhibition	Referenz
15	Bivalente Sialoside	HAI	30 (X31)	Glick & Knowles, 1991
		HAI	180 (X31)	Sabesan et al., 1992
	Cluster Sialoside	HAI	20 (X31)	Roy et al., 1993
20	Liposomale Sialoside	HAI	0.02 (X31)	Kingery-Wood et al, 1992
		HAI	0.33 (unknown)	Spevak et al., 1993
25	Sialylpolymere	FBI	0.3 (A/TX/77, A/BK/79)	Matrosovich et al, 1990
		HAI	0.2 (X31)	Spaltestein & Whitesides, 1991
		HAI	0.1 (X31)	Sparks et al., 1993
		HAI	0.2 (X31)	Lees et al., 1994
		MI	0.02 (X31, H3N2)	Itoh et al., 1995
			5 (WSN/33, H1N1)	Itoh et al., 1995
30			> 400 (SG/57, H2N2)	Itoh et al., 1995
		FBI	>50 (X31, H3N2)	Mochalova et al, 1994
			0.03 (USSR/85, H3N2)	Mochalova et al, 1994
			10 (Chile/83, H1N1)	Mochalova et al, 1994
			10 (B/USSR/83)	Mochalova et al, 1994
		MI	>8 (X31, H3N2)	Mochalova et al, 1994
35			0.2 (USSR/85, H3N2)	Mochalova et al, 1994
			4 (Chile/83, H1N1)	Mochalova et al, 1994
			>8 (B/USSR/83)	Mochalova et al, 1994
		HAI	0.001 (X31, H3N2)	Mamen et al, 1995
			0.02 (A/NIB/23/89M, H1N1)	
			0.01 (A/NIB/44/90M, H3N2)	
40	6SLN-PAA wie in Beispiel 5 der vorliegenden Erfindung beschrieben	FBI	0.02 (B/NIB/15/89M)	

Literatur

Bovin, N.V., Byramova, N.E., Tuzikov, A.B., Matrosovich, M.N., Mochalova, L.V., and Gambaryan, A.S. (1992) Viral attachment inhibitors, Patent PCT No. 5 PCT/US92/09745.

Byramova, N.E., Mochalova, L.V., Belyanchikov, I.M., Matrosovich, M.N., and Bovin, N.V. (1991) Synthesis of sialic acid pseudopolysaccharides by coupling of spacer-connected Neu5Ac with activated polymer. *J.Carbohydr.Chem.* 10, 691-700.

10 Fleischer, E.B., Gebala, A.E., Levey, A., Tasker, P.A. (1971). Conversion of aliphatic and alicyclic polyalcohols to the corresponding primary polyamines. *J.Organic Chem.*, Vol. 36, No. 20, 3042-3044.

Gambaryan, A.S. and Matrosovich, M.N. (1992) A solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity. *J.Virol.Methods*, 39, 111-123.

15 Glick, G.D., and Knowles, J.R. (1991). Molecular recognition of bivalent sialosides by influenza virus. *J.Amer.Chem.Soc.* 113, 4701-4703.

Gottschalk, A., Belyavin, G., Biddle, F. (1972). Glycoproteins as influenza virus haemagglutinin inhibitors and as cellular virus receptors. In "Glycoproteins. Their composition, structure and function", (A.Gottschalk, Ed.), 2-d edition, part B, pp.1082-1096. Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New-York.

20 Itoh, M., Hetterich, P., Isecke, R., Brossmer, R., and Klenk, H.-D. (1995). Supression of influenza virus infection by an N-thioacetylneuraminic acid acrylamide copolymer resistant to neuraminidase. *Virology* 212, 340-347 (1995).

Kingery-Wood, J.E., Williams, K.W., Sigal, G.B., and Whitesides, G.M., (1992). The agglutination of erythrocytes by influenza virus is strongly inhibited by liposomes incorporating an analog of sialyl gangliosides. *J.Amer.Chem.Soc.* 114, 7303-7305.

25 Krizanova, O., and Ratnova, V. (1969). Serum inhibitors of myxoviruses. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 47, 125-151.

Lees, W.J., Spaltenstein, A., Kingery-Wood, J.E., and Whitesides, G.M. (1994). Polyacrylamides bearing pendant  $\alpha$ -sialoside groups strongly inhibit agglutination of 30 erythrocytes by influenza A virus: multivalency and steric stabilization of particulate biological systems. *J.Med.Chem.* 37, 3419-3433.

Likhosherstov, L.M., Novikova, O.S., Derevitskaja, V.A., Kochetkov, N.K. (1986). A new simple synthesis of amino sugar  $\beta$ -D-glycosylamines. *Carbohydrate Research*, 146, C1-C5.

Mammen, M., Dahmann, G., Whitesides, G.M. (1995) Effective inhibitors of 5 hemagglutination by influenza virus synthesized from polymers having active ester groups. *Insight into mechanism of inhibition*. *J.Med.Chem.*, 38, 4179-4190.

Manger, I.D., Rademacher, T.W., Dwek, R.A. (1992). 1-N-Glycyl  $\beta$ -oligosaccharide derivatives as stable intermediates for the formation of glycoconjugate probes. *Biochemistry*, 31, 10724-10732.

10 Matrosovich, M.N., Mochalova, L.V., Marinina, V.P., Byramova, N.E., and Bovin, N.V. (1990). Synthetic polymeric sialoside inhibitors of the influenza virus receptor-binding activity. *FEBS Letters* 272, 209-212.

15 Matrosovich M.N., Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Byramova N.E., Mochalova L.V., Golbraikh A.A., Shenderovich M.D., Finne J., and Bovin, N.V. (1993). Probing of the receptor-binding sites of the H1 and H3 influenza A and influenza B virus hemagglutinins by synthetic and natural sialosides. *Virology* 196, 111-121.

20 Mochalova, L.V., Tuzikov, A.B., Marinina, V.P., Gambaryan, A.S., Byramova, N.E., Bovin, N.V., and Matrosovich, M.N. (1994) Synthetic polymeric inhibitors of influenza virus receptor-binding activity suppress virus replication. *Antiviral Research* 23, 179-190.

Robertson, J.S. (1993). Clinical influenza virus and the embryonated hen's egg. *Rev.Med.Viroi.* 3, 97-106.

Roy, R., and Laferriere, C.A. (1988). Synthesis of antigenic copolymers of N-acetyl-neuraminic acid and their binding to wheat germ agglutinin and antibodies. 25 *Carbohydr.Res.* 177, c1-c4.

Roy, R., Zanini, D., Meunier, S.J., and Romanowska, A. (1993). Solid-phase synthesis of dendritic sialoside inhibitors of influenza A virus hemagglutinin. *J.Chem.Soc., Chem. Commun.* 1993, 1869-1872.

Sabesan, S., Duus, J.O., Neira, S., Domaille, P., Keim, S., Paulson, J.C., and 30 Bock, K. (1992). Cluster sialoside inhibitors for influenza virus: synthesis, NMR, and biological studies. *J.Amer.Chem.Soc.* 114, 8363-8375.

Sauter, N.K., Hanson, J.E., Glick, G.D., Brown, J.H., Crowther, R.L., Park, S.-J., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1992) Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. *Biochemistry* 31, 9609-9621.

5 Spaltenstein, A., and Whitesides, G.M. (1991). Polyacrylamides bearing pendant  $\alpha$ -sialoside groups strongly inhibit agglutination of erythrocytes by influenza virus. *J.Amer.Chem.Soc.* 113, 686-687.

Spevak, W., Nagy, J.O., Charych, D.H., Schaefer, M.E., Gilbert, J.H., and Bednarski, M.D. (1993). Polymerized liposomes containing C-glycosides of sialic acid: 10 potent inhibitors of influenza virus in vitro infectivity. *J.Amer.Chem.Soc.* 115, 1146-1147.

Toogood, P.L., Galliker, P.K., Glick, G.D. and Knowles, J.R. (1991) Monovalent sialosides that bind tightly to influenza A virus. *J.Med.Chem.* 34, 3138-3140.

15 Watowich, S.J., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1994) Crystal structures of influenza virus hemagglutinin in complex with high-affinity receptor analogs. *Structure* 2, 719-731.

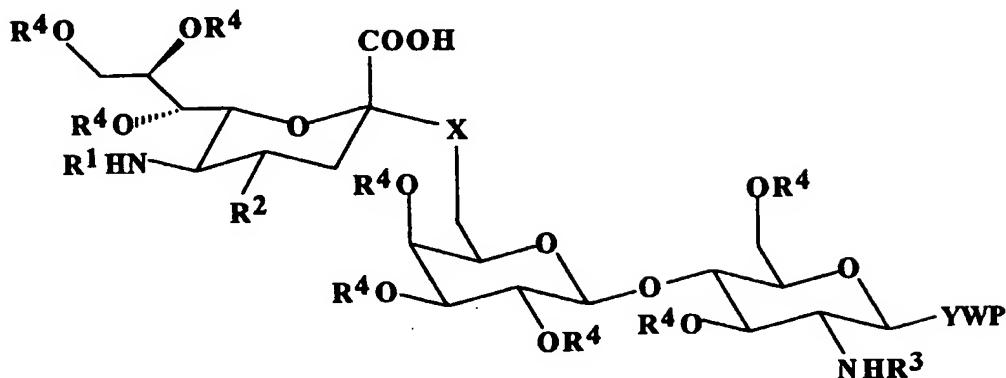
Weinhold, E.G. and Knowles, J.R. (1992) Design and evaluation of a tightly binding fluorescent ligand for influenza A hemagglutinin. *J.Am.Chem.Soc.* 114, 9270-9275.

20 Wiley, D.C. and Skehel, J.J. (1987) The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann.Rev.Biochem.* 56, 365-394.

Patentansprüche

1. Verbindungen der allgemeinen Formel,

5

worin R<sup>1</sup> - eine Acyl oder Thioacylgruppe bedeutet;10 R<sup>2</sup> - H, Hydroxyl, Z-Alkyl, substituiertes Z-Alkyl, Z-Aryl, substituiertes Z-Aryl bedeutet, und Z - O, S oder NH entspricht;R<sup>3</sup> - eine Acyl oder Thioacylgruppe bedeutet;15 R<sup>4</sup> - H oder Acyl darstellt;X - O, S oder ein lineares C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> Alkyl bedeutet;Y - NH, O, S, CH<sub>2</sub>, oder ein Zucker ist;

W - ein bifunktioneller Spacer ist;

20 P - ein multivalenter Träger bestehend aus einem der nachfolgenden Stoffe ist: Polyacrylat, Polyacrylamid, N-substituiertes Polyacrylamid, Metacrylamid, N-substituiertes Metacrylamid, Polyacrylsäure, Polycarbonat, Polyester, Polyamid, Polyanhydrid, Polyiminocarbonat, Polyorthoester, Polydioxanon, Polyphosphazen, Polyhydroxycarbonsäure, Polyaminosäure, Polysaccharid, Protein, Dextran, Chitosan, 25 Glucan, Liposom, Micropartikel.

2. Verbindungen der Formel I gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der multivalente Träger C(CH<sub>2</sub>NH-A<sub>n</sub>-)<sub>4</sub> darstellt, worin A eine neutrale oder negativ geladene Aminosäure ist.
- 5 3. Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 und 2 worin P mit Biotin, einem Farbstoff, einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem radioaktiven Marker markiert ist.
- 10 4. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 und 2 zur Bindung an Viren.
5. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 und 2 zur Bindung an Influenza Viren.
- 15 6. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 und 2 zur Bindung an menschliche Influenza Viren.
7. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß dem Anspruch 3 als Komponenten von Testsystemen zum Screenen von Inhibitoren der viralen
- 20 Zelladhäsion.
8. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 und 2 zur Bindung an Hemagglutinin von Influenza Viren.
- 25 9. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 und 2 als Inhibitoren der viralen Zelladhäsion an natürliche Rezeptoren.
10. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 4-9 in Kombination mit Neuraminidase-Inhibitoren.
- 30 11. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 und 2 zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung viraler Infektionen.

12. Verwendung der Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 und 2 zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung viraler Infektionen in Kombination mit Neuraminidase-Inhibitoren.